



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>5</sup> :  C07H 3/06, A23L 1/30, 1/236 C08B 37/18, C12P 19/18		A1	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 91/13076</b>  (43) Date de publication internationale: 5 septembre 1991 (05.09.91)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/BE91/00014</p> <p>(22) Date de dépôt international: 22 février 1991 (22.02.91)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 9000213 23 février 1990 (23.02.90) BE</p> <p>(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): RAFFINERIE TIRLEMONTOISE S.A. [BE/BE]; Avenue de Ter-vueren 182, B-1150 Bruxelles (BE).</p> <p>(72) Inventeurs; et</p> <p>(75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): COUSSEMENT, Paul [BE/BE]; Maria-Theresiastraat 100, B-3000 Leuven (BE). DE LEENHEER, Leen [BE/BE]; Jezus Eiklaan 64, B-3080 Tervuren (BE). SMITS, Georges [BE/BE]; Dr. De Cockstraat 16, B-9308 Gijzegem-Aalst (BE).</p> <p>(74) Mandataire: VAN MALDEREN, Michel; Office Van Malderen, Avenue J.-S. Bach 22/43, B-1080 Bruxelles (BE).</p>		<p>(81) Etats désignés: AT, AT (brevet européen), AU, BB, BE (brevet européen), BF (brevet OAPI), BG, BJ (brevet OAPI), BR, CA, CF (brevet OAPI), CG (brevet OAPI), CH, CH (brevet européen), CM (brevet OAPI), DE (modèle d'utilité), DE (brevet européen), DK, DK (brevet européen), ES, ES (brevet européen), FI, FR (brevet européen), GA (brevet OAPI), GB, GB (brevet européen), GR (brevet européen), HU, IT (brevet européen), JP, KP, KR, LK, LU (brevet européen), MC, MG, ML (brevet OAPI), MR (brevet OAPI), MW, NL, NL (brevet européen), NO, PL, RO, SD, SE, SE (brevet européen), SN (brevet OAPI), SU, TD (brevet OAPI), TG (brevet OAPI), US.</p> <p><b>Publiée</b>  <i>Avec rapport de recherche internationale.  Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i></p>	
<p>(54) Title: BRANCHED FRUCTO-OLIGOSACCHARIDES, A METHOD FOR OBTAINING THEM AND USES OF PRODUCTS CONTAINING THEM</p> <p>(54) Titre: FRUCTO-OLIGOSACCHARIDES RAMIFIES, PROCEDE POUR LEUR OBTENTION ET UTILISATION DES PRODUITS LES CONTENANT</p> <p>(57) Abstract</p> <p>Branched fructo-oligosaccharides consisting of a chain which comprises mainly fructose units and has a preferred chain length of 2 to 15 units, on which are fixed one or more side chains mainly composed of fructose units. The length of the side chain, which may be straight or branched, is of 1 to 10 units. A composition consisting of one or more of the above mentioned branched fructo-oligosaccharides and, particularly, mixtures comprising, apart from the branched fructo-oligosaccharides, other ingredients such as proteins, lipids or fatty acids, carbohydrates, fibres and other additives, are also described.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>La présente invention concerne des fructo-oligosaccharides ramifiés composés d'une chaîne comprenant principalement des unités de fructose et d'une longueur de chaîne préférentielle de 2 à 15 unités, sur laquelle est fixée une ou plusieurs chaînes latérales formées principalement d'unités de fructose. La longueur de la chaîne latérale, qui peut être ramifiée ou non, varie de 1 à 10 unités. La présente invention concerne également une composition constituée d'un ou plusieurs fructo-oligosaccharides ramifiés selon l'invention et, plus particulièrement, des mélanges comportant outre le ou les fructo-oligosaccharides ramifiés d'autres ingrédients tels que des protéines, des lipides ou acides gras, des hydrates de carbone, des fibres et d'autres additifs.</p>			

***UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION***

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	ES	Espagne	MG	Madagascar
AU	Australie	FI	Finlande	ML	Mali
BB	Barbade	FR	France	MN	Mongolie
BE	Belgique	GA	Gabon	MR	Mauritanie
BF	Burkina Faso	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BG	Bulgarie	GN	Guinée	NL	Pays-Bas
BJ	Bénin	GR	Grèce	NO	Norvège
BR	Brésil	HU	Hongrie	PL	Pologne
CA	Canada	IT	Italic	RO	Roumanie
CF	République Centrafricaine	JP	Japon	SD	Soudan
CG	Congo	KP	République populaire démocratique de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KR	République de Corée	SN	Sénégal
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SU	Union soviétique
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark				

FRUCTO-OLIGOSACCHARIDES RAMIFIES, PROCEDE POUR LEUR  
OBETENTION ET UTILISATION DES PRODUITS LES CONTENANT.

Objet de l'invention.

La présente invention concerne des fructo-oligosaccharides ramifiés présentant notamment des propriétés édulcorantes et d'agents de masse.

Elle concerne également les produits contenant ces fructo-oligosaccharides ramifiés et leur utilisation.

La présente invention s'étend enfin aux procédés particuliers pour leur préparation.

Résumé de l'état de la technique.

Un mode de vie sédentaire où le travail physique a presque disparu a considérablement modifié les besoins alimentaires.

En règle générale, on mange trop et souvent de manière déséquilibrée. Trop de graisses, trop de sel trop peu de sucres dits lents (complexes), et trop peu de fibres.

En particulier, la proportion de sucres dits lents a considérablement diminué dans nos régimes alimentaires, limitant ainsi leur apport énergétique.

Actuellement, les sucres dits rapides et les graisses fournissent les principaux apports énergétiques dans notre alimentation. On sait depuis longtemps, qu'une alimentation déséquilibrée conduit à long terme à des carences graves ou même à des maladies par exemple cardio-vasculaires.

En outre, une alimentation pauvre en fibres semble être la cause de nombreuses atteintes du système digestif.

On a de plus en plus conscience du lien étroit qui existe entre l'état de santé général et la manière de se nourrir. Aussi tend-on à adapter l'alimentation ou plus particulièrement la diététique, à nos besoins individuels.

Entre autres, le développement et l'utilisation d'édulcorants à haut pouvoir sucrant ont permis au

consommateur de mieux adapter son alimentation à ses besoins. Ces édulcorants permettent de donner un goût sucré aux aliments qui les contiennent sans devoir faire appel à des sucres fortement caloriques.

5 De cette manière, des boissons d'un apport calorique négligeable sont, par exemple, apparues sur le marché.

10 D'autre part, l'utilisation d'agents de masse est souvent indispensable dans une série d'aliments tels que la pâtisserie, la confiserie...

Habituellement on utilise du saccharose, des sirops de glucose ou de fructose comme agents de masse. Néanmoins ces sucres sont fortement caloriques.

15 A nouveau, il est apparu sur le marché des "sucres de remplacement" qui sont caractérisés par un apport calorique moindre.

20 Plus particulièrement, l'agent de masse idéal serait un produit naturel peu ou pas calorique, d'emploi sûr, sain, bien toléré par l'organisme, sans goût particulier et d'une mise en oeuvre comparable à celle du saccharose.

Les agents de masse répondant à ces exigences ont un grand potentiel commercial.

25 Les agents de masse sont faiblement caloriques s'ils satisfont à l'une des deux conditions suivantes :

- n'être que partiellement ou pas du tout assimilés dans le sang via l'intestin grêle;
- être assimilés dans le sang par l'intestin grêle mais peu ou pas métabolisés par l'organisme.

30 L'utilisation des fructo-oligosaccharides linéaires comme agents de masse est connue. Ces sucres, dont la présence naturelle dans l'alimentation est connue depuis longtemps, peuvent être obtenus par voie enzymatique (voir Albon et Al., J. Chem. Soc. (1953), p. 24-27; Kawai et Al., Agr. Biol. Chem. Vol. 37, n°9 (1973, p. 2111-2119; Tomoda et Al., Kyoritsu Yakka Daigaku Nempo vol. 20 (1975) p. 1-8) ou par hydrolyse de l'inuline.

Les fructo-oligosaccharides linéaires peuvent être produits industriellement à partir de sucre comme décrit dans le document GB-A-2000144 en obtenant des produits du type GF<sub>n</sub> (G = Glucose, F = Fructose, n = 5 à 10, liaisons du type 1-2), ou par hydrolyse de l'inuline, produisant un mélange de GF<sub>n</sub> et Fn (n = 2 à 10 et plus).

Ces fructo-oligosaccharides présentent les propriétés avantageuses suivantes : goût neutre et sucré, absence d'odeur, faible valeur calorique, effet de fibres alimentaires, effet bifidogène, caractère naturel et non toxique. De plus, ces produits présentent des caractéristiques technologiques telles qu'ils peuvent être mis en oeuvre selon les modes de préparation classiques des sucres et des sirops.

De même, ils peuvent être utilisés comme sucre de remplacement dans les applications classiques, par exemple comme édulcorants dans les aliments et les boissons ou comme matières de base ou excipients pour la préparation de produits pharmaceutiques.

De plus, ils peuvent être utilisés dans toutes les applications industrielles prévues pour les sucres et les sirops telles que la production d'adhésifs, d'humidificateurs, d'insecticides, de colorants, d'agents de tannage, d'isolateurs électriques, de liants pour noyaux de fonderie, ou de manière plus générale, comme matière ramollissante et/ou épaisissante et, bien entendu, dans le domaine plus particulier de l'alimentation comme produit de faible valeur calorique ou comme produit à effet de fibres alimentaires ou à effet bifidogène.

En règle générale, les agents de masse peu caloriques ne sont que partiellement assimilés dans l'intestin grêle et, de ce fait, passent dans le gros intestin où ils subissent en partie ou totalement une fermentation due à la flore intestinale.

Il s'agit d'un processus naturel que subissent toutes les fibres et qui est la cause de l'effet bénéfique dû aux fibres.

L'agent de masse est transformé par fermentation dans le gros intestin en une série de produits de réaction dont les principaux sont des acides gras volatils (VFA = Volatile Fatty Acids) et des gaz tels que CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> et dans certains cas CH<sub>4</sub>.

Ces gaz sont principalement éliminés par le sang et les poumons ou, en partie, par flatulence.

Lors du passage de l'agent de masse dans l'intestin grêle, les molécules de celui-ci absorbent de l'eau et passent dans le gros intestin. Ceci peut provoquer des diarrhées osmotiques lorsque l'agent de masse est pris en grande quantité. Bien entendu, cet effet dépend, essentiellement du pouvoir absorbant en eau de l'agent de masse et est, en général, plus élevé dans le cas de substances essentiellement à base de monosaccharides, que dans le cas des saccharides à degré de polymérisation plus élevé.

En particulier, les fructo-oligosaccharides linéaires qui ne sont pas ou peu assimilés dans l'estomac et l'intestin grêle, se retrouvent presque entièrement dans le gros intestin et, du fait de leur nature oligosaccharidique (faible degré de polymérisation), ils ne provoquent de diarrhées osmotique, que lorsqu'ils sont pris en grande quantité.

Cependant, les fructo-oligosaccharides linéaires, lorsqu'ils sont ingérés en grande quantité, peuvent provoquer une série d'inconvénients (et de malaises) dus principalement à leur caractère fermentable : flatulence augmentée, crampes intestinales, bruits gastriques, selles molles ou même diarrhées.

Plus précisément, on ne trouve pas de traces de fructo-oligosaccharides linéaires dans les selles, même pour de grandes quantités ingérées : ceci démontre qu'ils ont été complètement soumis à la fermentation par la flore intestinale.

En fait, il a été prouvé que les fructo-oligosaccharides linéaires sont dégradés par les bactéries appartenant à la famille des bifidobactéries, ce qui met

en évidence le caractère bifidogène des fructo-oligosaccharides linéaires.

Il est bien entendu que ces divers phénomènes dépendent de la dose ingurgitée, de la sensibilité de la personne concernée, de la forme sous laquelle on donne le produit contenant les fructo-oligosaccharides, de l'étalement dans le temps des prises ingérées, éventuellement de la période d'adaptation au produit et de la composition des autres ingrédients et, enfin, de la nature de l'agent de masse ingéré.

Ce sont d'ailleurs des malaises connus depuis longtemps, en particulier lors de l'ingestion de grandes quantités de prunes, de cerises ou d'oignons.

Ces effets secondaires indésirables sont la cause du fait que l'utilisation de ces agents de masse faiblement caloriques n'est pas illimitée.

En particulier, pour certains agents, le législateur a défini une dose journalière maximale. Cette dose s'élève par exemple, à 30 g pour certains sucres-alcools (polyalcools dérivés du sucre).

Même dans le cas d'agents de masse constitués de fructo-oligosaccharides linéaires, ces inconvénients subsistent bien que ces derniers soient en général mieux tolérés par l'organisme probablement du fait que l'effet osmotique est moindre que pour certains sucres-alcools.

Plus particulièrement, il est apparu que les fructo-saccharides à longue chaîne comme l'inuline, provoquent des phénomènes osmotiques encore plus réduits. Cependant, les effets négatifs dus à la fermentation par la flore intestinale n'ont pas totalement disparu.

De plus, ces fructo-oligosaccharides présentent une solubilité d'autant plus faible et une viscosité d'autant plus élevée que la longueur de chaîne est grande.

Il en résulte que les fructo-saccharides à longue chaîne ne présentent pas toutes les propriétés technologiques adéquates pour être utilisés comme agent de masse en lieu et place du sucre.

D'autre part, des polymères du fructose ont déjà été décrits dans les documents suivants:

- Dans Indian Journal of Biochemistry & Biophysics, vol. 13, Dec. 1976, pp. 398-410, Satyanarayana décrit des oligo-saccharides ramifiés que l'on peut trouver en petites quantités dans la nature. Il semble que la fructosyltransférase qui a été isolée à partir de l'Agave Vera Cruz ne soit pas à même de synthétiser cet oligosaccharide ramifié; de cette manière, il n'est pas possible de l'obtenir en grandes quantités.
- De même, dans Liebigs Annalen der Chemie, 614, 126 (1958), Schlubach a décrit des oligosaccharides ramifiés que l'on peut trouver dans la nature en faibles quantités.
- Dans Liebigs Annalen der Chemie, 635, 154 (1959), Schlubach a décrit également des produits naturels constitués d'unités de fructose polymérisés et ramifiés que l'on ne peut obtenir naturellement en grandes quantités.
- Dans Agric. Biol. Chem., 52(5) 1303-1304 (1988), Muramatsu décrit l'obtention par un microorganisme à partir de sucre, des oligosaccharides dont la structure est identique aux produits décrits dans le brevet EP-0307158.
- Dans Carbohydrate Research, 180 (1988), 315-324, Brasch et al. ont décrit un polymère de fructose (longueur de chaîne moyenne: 18) où 15% des unités de fructose comportent une ramification sur la position 0-6. Néanmoins, du fait de leur trop grande longueur de chaîne, ces molécules ne constituent pas un agent de masse adéquat.
- Le brevet EP-0 307 158 de Nihon Shokuhin décrit un polymère de fructose où apparaît une ramification sur une unité de glucose.

30 **Buts de l'invention**

La présente invention vise à produire des agents de masse ne présentant pas ou de manière fortement atténuée les troubles digestifs indésirables des agents de masse conventionnels.

Un autre but de la présente invention est de fournir un agent de masse présentant les mêmes propriétés avantageuses que les fructo-oligosaccharides linéaires, telles que goût neutre et sucré, absence d'odeur, faible valeur calorique, effet de fibres alimentaires, effet bifidogène,

caractère naturel et non-toxique du produit.

Un autre but de la présente invention consiste à obtenir des produits plus solubles.

Un autre but de la présente invention consiste à fournir des produits qui peuvent être mis en oeuvre de manière conventionnelle, selon les procédés classiques de préparation des sucres et des sirops.

D'autres buts complémentaires de la présente invention résident dans l'utilisation du produit de l'invention comme édulcorant, comme aliment faiblement calorique ou faiblement cariogène, comme produit bifidogène ou à effet de fibres, comme moyen d'abaisser le taux de cholestérol ou d'améliorer l'état de la flore intestinale,...

D'autres buts et avantages apparaissent dans la description qui suit.

#### Description de l'invention

La présente invention concerne des fructo-oligosaccharides ramifiés selon les revendications 1 à 6.

La présente invention concerne également une composition constituée d'un ou plusieurs fructo-oligosaccharides ramifiés selon l'invention, et plus particulièrement, des mélanges comportant outre le ou les fructo-oligosaccharides ramifiés d'autres ingrédients tels que des protéines, des lipides ou acides gras, des hydrates de carbone, des fibres et d'autres additifs.

En particulier, ces ingrédients peuvent être des produits repris dans la liste non limitative suivante: des édulcorants tels que le saccharose, le glucose, le fructose, les sirops de glucose ou les polyalcools dérivés de sucre tels que le sorbitol, le xylitol, l'érythritol, le mannitol, le maltitol, le lactitol, l'isomalt; des agents de masse tels que le polydextrose, la cellulose, l'hémicellulose, les fructo-oligosaccharides; ou encore des édulcorants à haut pouvoir sucrant tels que l'aspartame, l'acésulfame, la saccharine, la stévioside,...

Les produits selon l'invention sont particulièrement adéquats pour être utilisés dans l'alimentation humaine ou animale, comme agents de masse, comme édulcorants, comme aliments faiblement caloriques, ou faiblement cariogènes,

comme produits bifidogènes ou améliorant la flore intestinale, comme produits à effet de fibres alimentaires, comme agents diminuant le taux de cholestérol ou encore pour améliorer la tolérance des produits alimentaires.

5 Enfin, la présente invention concerne également les procédés de préparation de ces fructo-oligosaccharides ramifiés.

En particulier, les produits selon l'invention peuvent être obtenus par synthèse à partir de sucre ou de mélanges de fructose, éventuellement par l'intermédiaire de 10 catalyseurs ou d'enzymes ou par interaction d'enzymes différentes sur la saccharose des fructo-oligosaccharides, inuline ou fructanes ou par voie chimique, c'est-à-dire par polymérisation principalement du fructose, ou par extraction à partir de sources végétales contenant lesdits fructanes, ou encore 15 par hydrolyse des polymères de fructose ramifiés.

Les fructo-oligosaccharides selon l'invention peuvent, en particulier, être obtenus à partir du saccharose, de sirops de fructose, de fructose sous forme cristalline, de fructanes, de levanes, d'inuline, de leurs produits d'hydrolyse 20 ou, enfin, de produits extraits de plantes contenant des fructanes.

Par l'intervention de plusieurs enzymes, comme par exemple le fructosyltransférase, le levansucrase,..., il est également possible de former de façon sélective des liaisons permettant l'implantation d'unités de fructose à des positions déterminées sur d'autres unités de fructose dans les chaînes oligosaccharidiques. On peut utiliser les enzymes, soit conséutivement, soit simultanément. De préférence, on utilisera des enzymes qui forment préférentiellement des liaisons différentes à celles du substrat.

30 Pour la production de fructo-oligosaccharides ramifiés, on peut utiliser des procédés de condensation ou de synthèse, enzymatiques ou non, ou encore des procédés hydrolytiques.

Par condensation de monomères de fructose, on peut obtenir une polymérisation "at random", qui peut être suivie 35 d'une séparation chromatographique.

On peut également obtenir des fructo-oligosaccharides ramifiés par hydrolyse de molécules ramifiées synthétisées ou existant à l'état naturel.

Dans ce cas, on peut également utiliser plusieurs techniques différentes d'hydrolyse, notamment la technique d'hydrolyse acide, la technique d'hydrolyse alcaline ou la technique d'hydrolyse enzymatique.

5 En particulier, l'hydrolyse enzymatique spécifique comme par exemple l'interaction de l'endo-inulase sur le mélange de fructanes ramifiés, isolés du *Cordyline australis* ("cabbage tree") qui attaque spécifiquement les liaisons  $\beta(2 \rightarrow 1)$ , donne lieu à des fructo-oligosaccharides ramifiés.

10 Le résultat dépend de la nature du matériau de départ et de la technique d'hydrolyse utilisée et, éventuellement, des enzymes utilisées pour le procédé d'hydrolyse et des conditions de réaction. Selon les conditions de réaction, de nouvelles ramifications peuvent se produire pendant la 15 réaction d'hydrolyse des molécules ramifiées ou linéaires.

Les groupes terminaux réducteurs peuvent en plus être transformés chimiquement, comme par exemple, par oxydation, par réduction ou par hydrogénéation,...

La présente invention concerne également un procédé 20 permettant de rendre l'inuline plus soluble par une hydrolyse très partielle, suivie d'une réaction de ramification.

Les procédés utilisés et les produits obtenus sont mieux décrits à l'aide des exemples qui suivent.

25 **Exemple 1:** Obtention de polymères de fructane ramifiés par hydrolyse

Un mélange de fructanes ramifiés peut être obtenu à partir du "cabbage tree" (*Cordyline australis*) par extraction au méthanol, lavage à l'eau suivi d'une précipitation dans une solution d'acétone/éthanol et séchage.

30 Les substances obtenues sont principalement constituées d'unités de glucose et de fructose dans un rapport de 1 à 16, disposées en chaînes d'un degré de polymérisation moyen égal à 18, où environ 15% des unités de fructose présentent une ramification.

35 Une solution à 25° Brix est chauffée jusqu'à 90°C, puis du HCl 2N est ajouté rapidement jusqu'à obtention d'un pH de 2,5. Après 2 minutes de réaction, l'hydrolyse est arrêtée en ajoutant du NaOH (3 M) jusqu'à obtention d'un pH de 6,5.

10

Cette solution est ensuite filtrée et déminéralisée par un double traitement sur des échangeurs d'ions cationiques et anioniques. Le glucose, le fructose et le saccharose formés par hydrolyse sont ensuite éliminés sur une colonne cationique sous forme potassium par séparation chromatographique. Ainsi, le mélange d'oligosaccharides obtenu contient entre 5 et 10 % de mono- et disaccharides et de 90 à 95 % d'oligosaccharides. Le degré de polymérisation moyen de la composition ainsi obtenue est d'environ 5 et environ 40 % des molécules y sont ramifiées.

EXEMPLE 2 : Obtention du produit selon l'invention par synthèse

Dans ce cas, on utilise l'enzyme levansucrase dérivée du *Bacillus subtilis*.

On a remarqué que cette enzyme, par incubation dans des conditions appropriées en présence de saccharose et de fructo-oligosaccharides du type  $\beta(2-1)$  forme des fructo-oligosaccharides ramifiés.

Dans cet exemple, les fructo-oligosaccharides de base utilisés sont obtenus par hydrolyse enzymatique de l'inuline par l'endo-inulinase, obtenu à partir de la préparation enzymatique Novozyme 230.

Une solution à 40° Brix constituée de 50 % de saccharose et de 50 % de fructo-oligosaccharides de base est préparée dans une solution tampon au phosphate à 0,05 M à un pH de 6.

On ajoute au mélange une solution de levansucrase qui contient 20 U/ml - 1 U étant la quantité d'enzyme nécessaire à la libération de 1 micromôle de glucose par minute - de telle manière à obtenir 4 U de levansucrase par gramme de matière sèche d'hydrate de carbone dans le mélange. La solution est ensuite incubée à 30°C pendant 18 heures dans un agitateur orbital (150 t/min). Ensuite, la réaction enzymatique est arrêtée par la cuisson du mélange de réaction pendant 5 minutes.

Des  $\beta$ -Fructanes linéaires à longue chaîne (DP>12) sont séparés par précipitation avec 80 % d'éthanol.

Après centrifugation (30 minutes à 5000 t/min) et évaporation de l'éthanol sous vide, la solution est déminéralisée sur des échangeurs d'ions tels que décrit dans l'exemple 1.

5 Le mélange obtenu est ensuite soumis à une analyse chromatographique. Le chromatogramme est représenté à la figure 1.

10 Le mélange de réaction contient à ce moment environ 27 % de glucose, 3 % de fructose et 3 % de saccharose et 67 % de fructanes avec un DP>2, dont environ 60 % ont un DP<12 et 40 % ont un DP> 12. Cette fraction avec un DP> 12 ne peut pas être précipitée avec 80 % d'éthanol, ce qui est une indication de leur nature ramifiée. Environ 40 % des molécules ayant un DP de 3 à 12 sont ramifiées (cfr chromatogramme figure 1).

15 Les monosaccharides sont principalement éliminés par séparation chromatographique.

20 Le produit final ainsi obtenu contient environ 90 à 95 % de oligosaccharides avec un degré de polymérisation moyen égal à 4,5-5 et où 40 à 50 % des molécules sont ramifiées.

25 Les fructo-oligosaccharides ramifiés présentent des propriétés de tolérance inattendues, tout en conservant les autres propriétés avantageuses des fructo-oligosaccharides linéaires : goût neutre et sucré, absence d'odeur, faible valeur calorique, effet de fibres alimentaires, effet bifidogène, caractère naturel et non toxique.

30 Les fructo-oligosaccharides ramifiés peuvent également être utilisés comme sucre de remplacement dans toutes les applications classiques et industrielles décrites pour les fructo-oligosaccharides linéaires.

35 La tolérance améliorée de ces fructo-oligosaccharides ramifiés a été démontrée en réalisant les tests *in vitro* et *in vivo* suivants :

1. Tests IN VITRO.

Des matières fécales fraîches de sujets masculins en bonne santé ont été homogénéisées avec 5 fois leur poids de NaKCl isotonique dans un environnement.

12

anaérobique. Cinq fractions aliquotes de 10 ml de ce mélange homogénéisé ont été utilisées par groupe de tests.

5 Comme groupe de tests de référence, on a réalisé 5 incubations dans des éprouvettes contenant 20 g/l d'un mélange de fructo-oligosaccharides composé de 5 % de glucose, de fructose et de saccharose, de 35 % de GF2, de 50 % de GF3 et 10 % de GF4.

10 Comme deuxième groupe de tests, on a réalisé 5 incubations dans des éprouvettes contenant 20 ml/l du mélange de fructo-oligosaccharides ramifiés décrit à l'exemple 1.

15 Les éprouvettes sont obturées par une feuille de parafine dont le déplacement indique la production de gaz.

La formation de gaz a été suivie pendant 12 heures. Elle est exprimée en centimètres de déplacement par heure.

20 Ces tests montrent que la formation de gaz par heure pour les fructo-oligosaccharides ramifiés n'atteint que 35 % de celle due aux fructo-oligosaccharides linéaires.

## 2. Tests IN VIVO.

25 Lors d'une expérience effectuée sur trois sujets masculins sensibles à la fermentation dans le gros intestin, différentes quantités de fructo-oligosaccharides ont été mélangées dans du jus de fruits pris au petit-déjeuner, ce petit-déjeuner étant habituellement composé de jus de fruits, de pain et de café en quantité habituelle. La dose introduite est graduellement augmentée par doses de 10 g, à partir d'une dose initiale de 10 g également. Entre deux petits-déjeuners de test, il se passe au moins deux jours sans aucun test.

35 Les réactions des sujets ont été notées pour chaque concentration, et plus spécifiquement en ce qui concerne les critères suivants : flatulence, bruits gastriques, crampes intestinales, selles molles et diarrhée. La "dose d'arrêt" est définie comme la première dose où un ou plusieurs de ces effets secondaires

sont ressentis comme gênants.

Les substances testées qui ont été introduites dans le jus de fruits sont les suivantes :

substance A : mélange de fructo-oligosaccharides linéaires tels que décrits ci-dessus dans l'état de la technique;

substance B : mélange de fructo-oligosaccharides ramifiés tels que décrits dans l'exemple 2.

substance C : mélange contenant 50 % de la substance A et 50 % de la substance B.

Les résultats obtenus sont décrits dans le tableau suivant :

	<u>DOSE D'ARRET</u>	A	B	C
15	VOLONTAIRE 1	20 g	40 g	30 g
	VOLONTAIRE 2	30 g	60 g	50 g
	VOLONTAIRE 3	40 g	60 g	50 g

D'après ce tableau, on peut conclure que les fructo-oligosaccharides ramifiés sont mieux tolérés que les oligosaccharides linéaires et qu'en introduisant une certaine quantité de fructo-oligosaccharides ramifiés dans un mélange comprenant également des fructo-oligosaccharides linéaires, on augmente la tolérance de ce mélange.

#### Propriétés

##### Produit faiblement calorique

Les fructo-oligosaccharides ramifiés ne sont pas hydrolysés par les enzymes digestifs de l'homme. Ces substances sont donc d'un apport calorique faible.

##### Produit faiblement cariogène

Les fructo-oligosaccharides ramifiés sont moins cariogènes que le saccharose. Ceci s'explique par le fait qu'ils ne sont pas utilisés comme substrat pour la formation de la plaque dentaire et qu'ils sont moins en mesure de causer la formation d'acide par la flore buccale.

##### Produits à activité bifidogène et améliorant la flore intestinale

Les fructo-oligosaccharides ramifiés possèdent un effet bifidogène sélectif : ils stimulent de façon spécifique la croissance de la population bifide dans le gros intestin. Ceci s'explique par le fait que ces fructo-oligosaccharides sont utilisés comme source d'énergie par les bactéries appartenant au groupe des bifidobactéries, alors que les autres bactéries utilisent beaucoup plus difficilement ce substrat. En particulier, un certain nombre de bactéries putréfactives (telles que *Salmonella* et *Clostridium*) voient leur croissance limitée, ce qui entraîne une amélioration qualitative et quantitative de la flore intestinale.

Produit à effet de fibres alimentaires et diminuant le taux de cholestérol.

Les fructo-oligosaccharides possèdent un effet de fibres alimentaires : ils diminuent le temps de transit intestinal et augmentent la masse fécale. Ceci s'explique par le fait que ces fructo-oligosaccharides ne sont pas assimilés dans l'intestin grêle et passent dans le gros intestin où ils subissent une fermentation. Ces fructo-oligosaccharides provoquent également une diminution du taux de cholestérol dans le sang du fait de leur effet de fibres alimentaires.

Agent diurétique

Les fructo-oligosaccharides ramifiés peuvent être utilisés pour la prévention ou le traitement de tous les troubles qui peuvent être causés par la présence de produits comme par exemple des produits de dégradation accumulés qui peuvent être la cause de troubles aux reins, au foie ou du cancer,...

Produit améliorant la tolérance des autres produits.

On sait déjà que les fructo-oligosaccharides ramifiés sont mieux tolérés que leurs analogues linéaires.

En effet les molécules ramifiées constituent des substrats de fermentation plus difficiles pour la flore intestinale; la fermentation est donc freinée par la présence de ces molécules.

Il est donc possible d'améliorer la tolérance aux aliments fermentescibles en ajoutant des fructo-oligosaccharides ramifiés à l'alimentation, ceci du fait de la diminution et du ralentissement des phénomènes de fermentation.

Solubilité du produit.

Les fructo-oligosaccharides ramifiés possèdent une solubilité plus élevée que celle des composés linéaires, ce qui permet une mise en oeuvre plus aisée dans un certain nombre de produits (boissons rafraîchissantes ou à base de lait, autres produits laitiers, confiserie, boulangerie,...) où de fortes concentrations en sucres doivent être utilisées.

La conjonction de ces deux dernières propriétés, à savoir la tolérance accrue des fructo-oligosaccharides ramifiés et la solubilité accrue du produit selon l'invention favorise leur utilisation comme agent de masse.

Stabilité accrue en milieu acide

Les fructo-oligosaccharides ramifiés possèdent une meilleure stabilité en milieu acide que les composés linéaires, ce qui permet de limiter leur dégradation (formation de saccharides tels que fructose, glucose et saccharose) pendant la fabrication et la conservation d'aliments acides et de garantir à ces derniers des caractéristiques plus constantes pendant leur durée de vie.

L'accroissement de la stabilité en milieu acide a été mis en évidence lors d'une expérience comparative réalisée avec deux substances :

substance A : mélange de fructo-oligosaccharides linéaires contenant

5 % de glucose, fructose et saccharose

35 % de GF2.

35 % de GF3

10 % de GF4

substance B : mélange de fructo-oligosaccharides ramifiés tels que décrits dans l'exemple 1.

Chacune des substances A et B a été mise en solution aqueuse à 10° Brix; le pH a ensuite été ajusté à 3,5 à l'aide d'acide chlorhydrique.

5 Les solutions ainsi obtenues ont été conservées plusieurs semaines à 20°C. La stabilité des fructo-oligosaccharides dans ces solutions a été suivie par l'évolution des teneurs en glucose et saccharose (déterminées par chromatographie gazeuse) en cours de conservation.

10 Les résultats obtenus sont décrits dans le tableau ci-dessous :

Tableau : Teneur en fructose, glucose et saccharose en %

15	Temps de conservation à 20°C et pH = 3,5	Substance	
		A	B
	0	5	5
	4 semaines	18	11
	8 semaines	32	21

#### Applications.

20 Les fructo-oligosaccharides ramifiés peuvent être incorporés dans des aliments ou conditionnés sous forme de granules, ou de tablettes. Dans ce dernier cas ils peuvent être utilisés comme composition pharmaceutique orale, par exemple pour stimuler sélectivement la croissance de la population bifide, comme diurétique,...

25 Les fructo-oligosaccharides possèdent des propriétés comparables à celles du sucre et des sirops de glucose; de ce fait on peut les mettre en oeuvre de la même façon. Ils peuvent remplacer le sucre et les sirops de glucose dans la plupart des applications, notamment dans les produits suivants :

- confiserie (bonbons,...),
- produits gélifiés (gommes,...),
- préparations à base de chocolat,
- chewing-gum,
- biscuiterie,
- glaces et sorbets,
- produits laitiers,

- boissons à base de fruits,
- confitures et préparations de fruits,
- caramels,
- préparations pharmaceutiques, ...

5 Les fructo-oligosaccharides ramifiés possèdent en particulier les propriétés adéquates pour remplacer le sucre et les sirops de glucose dans la préparation de produits faiblement caloriques, faiblement cariogènes, bifidogènes, et/ou de régime.

10 La présente invention est illustrée par une série non limitative d'exemples d'applications possibles.

15 Comme produit de base, on a utilisé un sirop de fructo-oligosaccharides ramifiés préparé tel que décrit dans l'exemple 1 ou l'exemple 2.

20 Les produits selon l'invention ont été évalués par un panel d'une vingtaine de dégustateurs afin de comparer leurs propriétés à celles de produits conventionnels à base de saccharose et/ou de sirop de glucose. Ces tests ont révélé une bonne acceptation des produits à base de fructo-oligosaccharides ramifiés.

EXAMPLE 3 : Préparation d'une glace au lait.

Ingrédients (en poids) :

25	Poudre de lait écrémé	13,00
	Eau	62,46
	Crème (35 % de matière grasse)	8,60
	Fructo-oligosaccharides ramifiés de l'exemple 1	15,00
	Stabilisateur	0,50
30	(Cremodan SE30, Grindsted Products)	
	Arôme vanille (Silesia 111/8309280)	0,40
	Aspartame (NutraSweet)	0,04

Composition :

	Matière sèche totale	28,5 %
	Matière sèche laitière	16,0 %
	Matière grasse laitière	3,0 %

Préparation :

Les différents ingrédients sous forme de poudre sont mélangés à sec et dissous dans l'eau.

Les fructo-oligosaccharides ramifiés, l'arôme et la crème sont ensuite ajoutés. On mélange jusqu'à l'obtention d'un produit homogène. On chauffe ensuite jusqu'à 80°C et cette température est maintenue pendant 30 secondes. Ensuite, on homogénéisée à chaud (mixer), on refroidit jusqu'à 5°C et on laisse reposer quelques heures au réfrigérateur. On aère (100 %) et on congèle dans une machine à glacer (CARPIGANI).

On conserve au surgélateur.

EXEMPLE 4 : Préparation d'un sorbet.

Ingrédients (en poids) :

Purée de fraises (6,5 % de matière sèche)	74,48
Fructo-oligosaccharides ramifiés de	25,00
l'exemple 1	
Stabilisateur	0,45
(Fructodan SL64, Grinsted Products)	
Aspartame (NutraSweet)	0,07

Composition : 25 % de matière sèche.

20 Préparation :

Les ingrédients sont bien mélangés, chauffés à 80°C et maintenus à cette température pendant 30 secondes. Ensuite, le mélange est refroidi à 5°C et maintenu au réfrigérateur pendant quelques heures.

25 On aère (75 %) et congèle dans une machine à glacer (CARPIGANI).

On conserve au surgélateur.

EXEMPLE 5 : Préparation d'une confiture.

Ingrédients (en poids) :

Fraises (10 % de matière sèche)	65,00
Fructo-oligosaccharides ramifiés de	42,00
l'exemple 1	
Eau	25,00
Pectine (LM 27NH95, Sanofi Bio-Industrie)	1,00
Acide citrique (50 %)	0,80

Composition : 40 % de matière sèche.

Préparation :

La pectine est dissoute dans de l'eau chaude (60°C), puis elle est bien mélangée avec les frai-

ses. On laisse cuire tout en remuant bien le mélange, jusqu'à l'obtention d'un produit d'un poids de 57 g.

5 Les fructo-oligosaccharides ramifiés, chauffés à 60°C sont alors ajoutés. On ajoute ensuite l'acide citrique. On laisse refroidir jusqu'à 75°C et on conditionne en pots de verre.

EXEMPLE 6 : Préparation d'un yoghourt.

Ingrédients (en poids)

10	Lait entier (3,7 % de matière grasse)	94,10
	Poudre de lait écrémé	1,90
	Ferments de yoghourt	1,00
	Fructo-oligosaccharides ramifiés de l'exemple 1	3,00

15 Composition :

Matière sèche totale	16,0 %
Matière sèche laitière	13,5 %
Matière grasse laitière	3,5 %

Préparation :

20 La poudre de lait et les fructo-oligosaccharides ramifiés sont mélangés avec le lait froid. Ensuite, on chauffe le mélange jusqu'à 60°C et on l'homogénéise. On le chauffe alors jusqu'à 90°C et on maintient cette température pendant 10 minutes.

25 On refroidit jusqu'à 45°C et onensemencé avec des ferments lactiques. On transvase le mélange dans des bocaux préchauffés et on incube à 43°C jusqu'à un pH de 4,2.

On conserve à 10°C maximum.

30 EXAMPLE 7 : Préparation d'un cake.

Ingrédients (en poids)

	Fructo-oligosaccharides ramifiés de l'exemple 1	25,30
	Margarine	8,50
35	Oeufs entiers	10,10
	Carbonate d'ammonium/bicarbonate	0,40
	Farine	33,65
	Lait	6,80
	Raisins	10,10

20

Fruits secs	5,10
Acésulfame K	0,05

Préparation :

5           Mélanger les fructo-oligosaccharides ramifiés avec la margarine, ajouter les oeufs, et le carbonate d'ammonium, l'Acésulfame K et le bicarbonate dissous dans 0,5 litre de lait. Ajouter la farine et le reste du lait. Mélanger jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène. Ajouter alors les raisins et les 10 fruits secs. Transvaser le tout dans un moule et enfourner à 250°C.

EXEMPLE 8 : Préparation d'une génoise.Ingrédients (en poids) :

Fructo-oligosaccharides ramifiés de l'exemple 1	27,00
Oeufs	49,80
Farine	27,00
Beurre	8,30
Acésulfame K (Hoechst)	0,05

Préparation :

Battre les fructo-oligosaccharides ramifiés et les oeufs entiers au bain-marie jusqu'à l'obtention d'une mousse épaisse, d'une densité de +/-0,75.

25           Tamiser la farine et l'ajouter à la pâte, en mélangeant doucement. Chauffer le beurre jusqu'à ce qu'il soit à moitié liquide et le mélanger à la pâte. Verser la pâte dans un moule déjà graissé et cuire au four à 175° pendant 20 minutes.

EXEMPLE 9 : Préparation de gommes.Ingrédients (en poids) :

Fructo-oligosaccharides ramifiés de l'exemple 2	94,00
Gélatine 200 BLS (Sanofi Bio-Industrie)	6,50
Eau	13,50
Solution d'acide citrique à 50 %	1,50
Cola LE 1613 (Sanofi Bio-Industrie)	0,10
Aspartame	0,26

Matière sèche du produit fini : 80 %.

Préparation :

La gélatine est dissoute dans de l'eau chaude (80°-90°C). Les fructo-oligosaccharides ramifiés sont cuits à 115°C. Ensuite, le sirop est refroidi jusqu'à 100°C. La solution de gélatine est alors ajoutée à ce sirop. Les bulles d'air sont éliminées de ce sirop en l'amenant sous vide ou en le laissant reposer. La masse est refroidie jusqu'à environ 80°C. L'arôme, le colorant, l'Aspartame et l'acide citrique sont ajoutés et le mélange est coulé dans des formes en amidon. L'amidon est utilisé à une température d'environ 30°-35°C. Les gommes sont recouvertes d'une couche d'amidon et sont gardées au repos pendant 24 heures à température ambiante. Les gommes sont ensuite dépoudrées et recouvertes d'huile.

EXEMPLE 10 : Préparation de gommes dures.Ingrédients (en poids) :

20	Fructo-oligosaccharides ramifiés de l'exemple 2	96,50
	Gélatine GAT 15	11,00
	Eau	16,50
	Solution d'acide citrique à 50 %	1,50
	Arôme mandarine LE 1450(Sanofi Bio-Industries)	0,25
25	Aspartame	0,28

Matière sèche du produit fini : 88 %.

Préparation :

La gélatine est dissoute dans de l'eau chaude (80°-90°C). Les fructo-oligosaccharides ramifiés sont cuits à 113°C. Ensuite, le sirop est refroidi jusqu'à 100°C. La solution de gélatine est alors ajoutée à ce sirop. Les bulles d'air sont éliminées de ce sirop, et la masse est refroidie jusqu'à environ 80°C. L'arôme, le colorant, l'Aspartame et l'acide citrique sont ajoutés. Le mélange est coulé dans des formes en amidon. L'amidon est utilisé à une température d'environ 30°-35°C. Les gommes sont couvertes d'une couche d'amidon.

22

On les laisse reposer dans un four ventilé à 50°C pendant 72 heures. Ensuite, les gommes sont dépouillées et huilées.

EXEMPLE 11 : Préparation de sucre cuit (bonbons).

5      Ingrédients (en poids) :

	Fructo-oligosaccharides ramifiés de l'exemple 1	125,00
	Acide citrique (100 %)	0,83
	Extrait BE4017 (Sanofi Bio-Industrie)	0,10
10	Arôme citron LE 1616 (Sanofi Bio-Industrie)	0,15
	Acésulfame K	0,34

Matière sèche du produit fini : 98 %.

Préparation :

15      Les fructo-oligosaccharides ramifiés sont chauffés à une température de 165°C, jusqu'à obtention d'une matière sèche de 98 %.

20      Le sirop est refroidi jusqu'à une température de +/-110°C; ensuite, le colorant, l'arôme, l'Acésulfame K et l'acide citrique sont mélangés au produit obtenu. Le produit obtenu est ensuite versé dans des moules. Après refroidissement les bonbons sont retirés des moules.

EXEMPLE 12 : Préparation de caramels.

Ingrédients (en poids) :

25	Fructo-oligosaccharides ramifiés de l'exemple 1	68,60
	Lait concentré sucré	26,00
	Matière grasse à point de fusion de 32°C	5,20
	Sel	0,20
30	Lécithine	0,20
	Acésulfame K	0,24

Préparation :

Dissoudre la lécithine dans la matière grasse au bain-marie à 70°C.

35      Verser les fructo-oligosaccharides ramifiés, le lait concentré sucré, le sel, l'Acésulfame K et le mélange composé de matière grasse et de lécithine dans un cuiseur. Mélanger et chauffer le mélange jusqu'à 55-60°C.

23

Augmenter la température jusqu'à 119-121°C. Verser ensuite sur une table de refroidissement et laisser refroidir jusqu'à 35-40°C.

EXEMPLE 13 : Préparation d'un pudding.

5      Ingrédients (en poids) :

	Lait écrémé	84,94
	Poudre de lait écrémé	1,80
	Fructo-oligosaccharides ramifiés de l'exemple 1	10,00
10	Aspartame (NutraSweet)	0,03
	Amidon (Snowflake 06304, Cerestar)	3,00
	Carraghénane (Genulacta SGI-1, Hercules)	0,20
	Arôme vanille (Flav-o-lok 630019H, PFW Products)	0,02
15	Colorant jaune crème (51798, Ned.Kleurstofindustrie)	0,01

Composition : 20 % de matière sèche.

Préparation :

20      Les ingrédients en poudre sont mélangés à sec; ensuite, on ajoute le lait froid. On mélange alors jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène.  
On chauffe jusqu'à 95°C et on maintient le mélange à cette température pendant 5 minutes.  
On refroidit le tout jusqu'à 50°C en agitant le mélange. On conditionne dans des coupes et on conserve au réfrigérateur.

EXEMPLE 14 : Préparation d'une boisson à base de fruits.

Ingrédients (en poids) :

	Jus de fruit concentré	3,80
30	(Orange PG31332, Quest Int.)	
	Fructo-oligosaccharides ramifiés de l'exemple 1	7,00
	Saccharose	7,50
	Acide citrique (50 %)	0,30
35	Eau	81,40

Composition :

Matière sèche	14,5 %
Jus de fruit	15,0 %

Préparation:

Dissoudre le sucre dans l'eau. Ajouter les autres ingrédients et mélanger efficacement. Conserver au réfrigérateur.

5 Exemple 15: Traitement enzymatique de l'inuline

Une solution de base à 40 Brix, constituée de 50% de saccharose et de 50% d'inuline, contenant une large proportion de molécules à un degré de polymérisation (DP) élevé, est ajustée à un pH de 5,4. Cette solution est divisée en 10 deux fractions.

On ajoute à la première fraction une solution de levansucrase (LS) de telle manière à obtenir 2 U de levansucrase par gramme de matière sèche en portant le pH à 5. La solution est ensuite incubée à 37°C pendant 18 heures.

15 Ensuite la réaction enzymatique est arrêtée par la cuisson du mélange de réaction pendant cinq minutes.

A la seconde fraction on ajoute 0,6 U d'endo-inulase, obtenue à partir de la préparation enzymatique Novozyme 230, par gramme de matière sèche. L'incubation est 20 arrêtée après une heure par cuisson du mélange de réaction pendant cinq minutes. Ensuite on ajoute une solution de levansucrase comme décrit plus haut.

25 Le pourcentage de précipitation dans une solution de 80% d'éthanol est déterminé pour les différentes fractions:

	% de précipité calculé sur l'ensemble des produits avec DP > 2
solution de base	66
solution de base + LS	40
solution de base + endoinul.	15
30 solution de base + endoinul. + LS	2,5

Ceci démontre que l'action de la levansucrase a des conséquences importantes sur la solubilité des carbohydrates linéaires du type inuline. Il est évident que d'autres chaînes linéaires, p. e. à base de liaisons 2 → 6 (type phlein) peuvent aussi bien être ramifiées en employant un enzyme

adéquat, qui forme préférentiellement d'autres liaisons que celles de la chaîne linéaire, comme par exemple du type 2-1 (le fructosyltransférase). Cette technique pourrait même être appliquée à des chaînes glucosidiques.

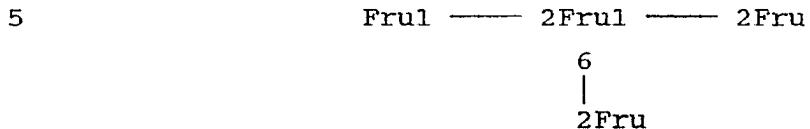
5 En partant d'une inuline à un DP moyen nettement inférieur à celle utilisée dans l'exemple, p.e. en partant de l'inuline de topinambour, on peut faire agir directement la levansucrase sur l'inuline sans hydrolyse préalable.

En annexe 1 on donne, en forme de tableau, l'analyse chromatographique en phase gazeuse des différentes fractions. Comme on peut le voir dans ce tableau, on constate une augmentation de la proportion de produits à DP 5, DP 6, DP 7, DP 8, DP 9, DP 10 et de produits solubles qui n'ont pas pu être séparés par la colonne employée (DP 10+). Sur le chromatogramme on peut en plus voir que la forme de certains pics du produit de réaction est différente des pics du produit de départ (la présence d'une épaule, indiquant la présence de deux produits) et qu'en plus on a formé d'autres produits qu'on ne peut non plus retrouver dans le chromatogramme du levane. Ceci démontre bien que la levansucrase a transféré les molécules de fructose à partir du sucrose vers la chaîne linéaire.

Ensuite on élimine le glucose de la fraction qui a été traitée avec l'endoinulase et la levansucrase par fermentation. Le produit ainsi obtenu est perméthylé suivant la méthode légèrement adaptée décrite dans l'article de Goran Larson et al.: "Application of a simple methylation procedure for the analysis of glycosphingolipids" paru dans Carbohydrate Research, Vol 161, p. 281-290 (1987).

30 Après la perméthylation, l'hydrolyse qui permet de produire des monosaccharides, et la silylation des monosaccharides, ceux-ci sont séparés en diméthyl-, triméthyl- et tetraméthylfructoses par chromatographie en phase gazeuse. La présence du diméthylfructose dans le chromatogramme est 35 une preuve de la présence dans les chaînes saccharidiques de molécules de fructose liées à trois autres molécules. En plus on peut détecter des isomères du triméthylfructose comme le 3,4,6 - et le 1,3,4 triméthylfructose indiquant la présence

dans les molécules de liaison  $1 \rightarrow 2$  et  $2 \rightarrow 6$ . Ceci prouve bien que l'action de la levansucrase sur la chaîne linéaire de l'inuline donne lieu à des ramifications aussi bien du type:



que du type:



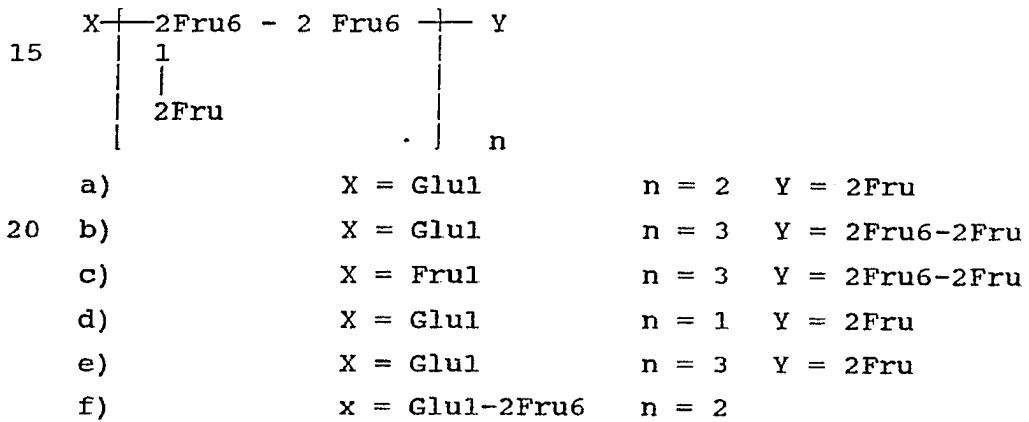
Le tableau I qui suit indique le résultat de l'analyse chromatographique en phase gazeuse des différentes fractions des produits de l'exemple 15.

TABLEAU I

	INULINE+SACCHAROSE (50/50) (A)	A+LS	A+ENDO 1hr	B+LS
		(B)		
	Fructose	1,3	4,8	1,4
	Glucose	0,45	28	0,5
20	Saccharose	49,7	9,5	51,4
	DFA	0,2	0,3	0,3
	F2	0,4	0,2	0,4
	GF2	1,3	0,6	1,3
	F3	1,6	0,01	6,5
25	GF3	1,8	0,7	2
	F4	1,0	0,1	5,5
	GF4	2	0,9	4,3
	F5	0,4	2,4	3
	GF5	1,8	0,9	3,7
30	F6	0,3	0,2	2
	GF6	1,4	1	3
	F7	0,1	0,1	1,2
	GF7	1,2	1,1	1,2
	F8	0,1	0,2	0,3
35	GF8	1	1,3	0,6
	F9	0,05	0,1	0,2
	DP10	0,2	1,1	0
	DP10+	0	22	3,8
	Précipité	33	23,5	7, 1
				1,7

## REVENDICATIONS

1. Fructo-oligosaccharide ramifié composé d'une chaîne principale et d'une ou plusieurs chaînes latérales caractérisé en ce que la chaîne principale et la ou les 5 chaînes latérales sont essentiellement constituées d'unités de fructose, les ramifications étant principalement sur des unités de fructose, à l'exclusion des produits naturels: kestose,  $O-\beta-D\text{-fructofuranosyl}\text{-(2}\rightarrow 1\text{)}\text{-O-[}O-\beta-D\text{-fructofuranosyl}\text{-(2}\rightarrow 6\text{)}\text{]-}\beta-D\text{-fructofuranosyl-}\alpha-D\text{ glucopyranoside}$ ,  $O-\beta-D\text{-fructofuranosyl-(2}\rightarrow 1\text{)}\text{-}\beta-D\text{-fructofuranosyl-(2}\rightarrow 1\text{)}\text{-O[}O-\beta-D\text{-fructofuranosyl-(2}\rightarrow 6\text{)}\text{]-}\beta-D\text{-fructofuranosyl-}\alpha-D\text{ glucopyranoside}$  et des produits ayant la structure suivante:



2. A titre de produit industriel, obtenu par synthèse, fructo-oligosaccharide ramifié composé d'une chaîne principale et d'une ou plusieurs chaînes latérales caractérisé en ce que la chaîne principale et la ou les chaînes latérales sont essentiellement constituées d'unités de fructose, les ramifications étant principalement sur des unités de fructose, à l'exclusion de kestose.

3. Fructo-oligosaccharide ramifié selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce que la chaîne principale comporte de 2 à 15 unités qui sont de préférence des unités de fructose.

4. Fructo-oligosaccharide ramifié selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 caractérisé en ce que la ou les chaînes latérales comportent de 1 à 15 unités qui sont

de préférence des unités de fructose.

5. Fructo-oligosaccharide ramifié selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 caractérisé en ce que la ou les chaînes latérales ne sont pas ramifiées.

5 6. Fructo-oligosaccharide ramifié selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 caractérisé en ce qu'une ou plusieurs chaînes latérales sont à leur tour ramifiées en des chaînes latérales supplémentaires.

10 7. Procédé pour la préparation de fructo-oligo-saccharides ramifiés selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 caractérisé en ce qu'on obtient lesdits fructo-oligosaccharides par extraction et/ou hydrolyse de fructane ramifiés ou linéaires, ou des sources végétales contenant lesdits fructanes.

15 8. Procédé pour la préparation de fructo-oligo-saccharides ramifiés selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 caractérisé en ce qu'on obtient lesdits fructo-oligosaccharides par synthèse enzymatique à partir de saccharides contenant du fructose tels que le fructose, le saccharose ou les fructo-oligosaccharides en utilisant soit un enzyme qui forme préférentiellement des liaisons différentes à celles du substrat soit plusieurs enzymes simultanément ou non qui forment préférentiellement des liaisons différentes.

25 9. Procédé pour la préparation de fructo-oligo-saccharides ramifiés caractérisé en ce qu'on obtient lesdits fructo-oligosaccharides par combinaison des procédés des revendications 7 et 8.

30 10. Procédé pour améliorer la solubilité des fructanes linéaires caractérisé en ce qu'on effectue une réaction de ramifications selon l'une quelconque des revendications 7 à 9, précédée ou pas, suivant le degré de polymérisation du fructane linéaire, d'une hydrolyse partielle.

35 11. Procédé pour améliorer la solubilité de l'inuline caractérisé en ce qu'on performe une réaction de ramifications, précédée ou pas, suivant le degré de polymérisation de l'inuline, d'une hydrolyse partielle.

12. Composition caractérisée en ce qu'elle contient un ou plusieurs fructo-oligosaccharides ramifiés selon l'une

quelconque des revendications 1 à 6 et/ou obtenu par le procédé d'une quelconque des revendications 7 à 9.

13. Composition caractérisée en ce qu'elle contient outre la composition selon la revendication 12 d'autres 5 ingrédients.

14. Composition selon la revendication 13 caractérisée en ce que le ou les ingrédients sont des produits, tels que des protéines, des lipides ou acides gras, des hydrates de carbone, des fibres alimentaires ou des additifs.

10 15. Composition selon la revendication 13 ou 14 caractérisée en ce que l'on ajoute des édulcorants tels que le sucre, le glucose, le fructose, les produits d'hydrolyse de l'amidon, la palatinose, les sucres-alcools tels que le sorbitol, le xylitol, l'érythritol, le mannitol, le maltitol, 15 le lactitol, l'isomalt, le leucritol; des agents de masse faiblement caloriques tels que le polydextrose, la cellulose, l'hémicellulose, les fructo- ou autres oligosaccharides; des édulcorants à haut pouvoir sucrant tels que l'aspartame, l'acésulfame, la saccharine, la stévia, le sucralose et 20 autres édulcorants dipeptiques.

16. Aliment pour êtres humains ou animaux caractérisé en ce qu'il comprend un ou plusieurs fructo-oligosaccharides ramifiés selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou obtenu par le procédé selon l'une quelconque des revendications 7 à 9 ou une composition selon l'une quelconque des revendications 12 à 15.

17. Utilisation du produit selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou de la composition selon l'une quelconque des revendications 12 à 16 comme agent de masse.

30 18. Utilisation du produit selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou de la composition selon l'une quelconque des revendications 12 à 16 comme édulcorant.

19. Utilisation du produit selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou de la composition selon l'une 35 quelconque des revendications 12 à 16 comme aliment faiblement calorique.

20. Utilisation du produit selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou de la composition selon l'une

quelconque des revendications 12 à 16 comme aliment faiblement cariogène.

21. Utilisation du produit selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou de la composition selon l'une 5 quelconque des revendications 12 à 16 comme agent bifidogène.

22. Utilisation du produit selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou de la composition selon l'une quelconque des revendications 12 à 16 comme agent améliorant la flore intestinale.

10 23. Utilisation du produit selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou de la composition selon l'une quelconque des revendications 12 à 16 comme agent diminuant le taux de cholestérol.

15 24. Utilisation du produit selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou de la composition selon l'une quelconque des revendications 12 à 16 comme agent à effet de fibres alimentaires.

20 25. Utilisation du produit selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou de la composition selon l'une quelconque des revendications 12 à 16 comme agent de masse mieux toléré ou améliorant la tolérance des autres ingrédients.

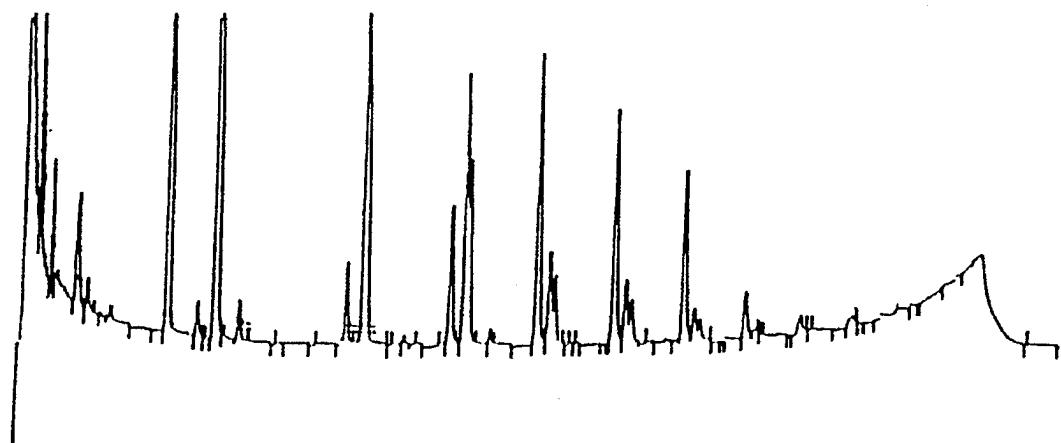
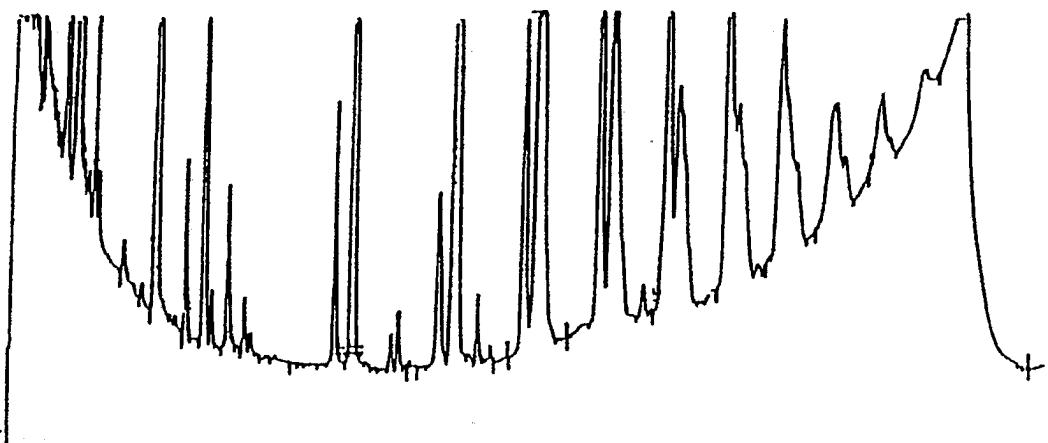
25 26. Utilisation du produit selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou de la composition selon l'une quelconque des revendications 12 à 16 comme diurétique.

30 27. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend un fructo-oligosaccharide ramifié selon l'une quelconque des revendications précédentes 1 à 6 ou une composition selon l'une quelconque des revendications 12 à 15.

28. Composition pharmaceutique selon la revendication 27 caractérisée en ce qu'elle comprend en outre un support.

1 / 1

Figure 1

 $t = 0h$  $t = 18h$ 

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/BE 91/00014

## I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) \*

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC

Int.C1. 5 C 07 H 3/06, A 23 L 1/30, A 23 L 1/236, C 08 B 37/18,  
C 12 P 19/18

## II. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched 7

Classification System	Classification Symbols
Int.C1. 5	C 07 H, A 23 L, C 08 B

Documentation Searched other than Minimum Documentation  
to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched 8

## III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT 9

Category *	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>
X	Liebigs Annalen der Chemie, Verlag chemie (Weinheim, DE), volume 614, 1958, H.H. Schlubach et al. "Die Bildung der verzweigten Polyfructosane in den Roggenhalmen", pages 126-136, see pages 131-2, 134 (cited in the application) ---	1-7
A	EP, A, 0337889 (ROUSSEL-UCLAF)) 18 October 1989 ---	
A	Patent Abstract of Japan volume 13, No. 151 (C-584)(3499) 12 April 1989, & JP, A, 63309183 (ICHIMARU PHARCOS CO.) 16 December 1988 ---	
X	Journal of the Chemical Society, 1951, part II, The Chemical Society, (London, GB), P.C. ARNI et al. "Studies on Fructosans", pages 1822-30, see the whole document -----	1-7

\* Special categories of cited documents: <sup>10</sup>

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

## IV. CERTIFICATION

Date of the Actual Completion of the International Search  
16 May 1991 (16.05.91)

Date of Mailing of this International Search Report  
27 June 1991 (27.06.91)

International Searching Authority  
European Patent Office

Signature of Authorized Officer

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO. BE 9100014  
SA 44686

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 21/06/91. The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP-A- 0337889	18-10-89	FR-A-	2629985	20-10-89

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale N° PCT/BE 91/00014

## I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) <sup>7</sup>

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB  
 CIB<sup>5</sup>: C 07 H 3/06, A 23 L 1/30, A 23 L 1/236, C 08 B 37/18,  
 CIB: C 12 P 19/18

## II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTÉ

Documentation minimale consultée <sup>8</sup>

Système de classification	Symboles de classification
CIB <sup>5</sup>	C 07 H, A 23 L, C 08 B

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté <sup>9</sup>

## III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS <sup>10</sup>

Catégorie <sup>11</sup>	Identification des documents cités, <sup>11</sup> avec indication, si nécessaire, des passages pertinents <sup>12</sup>	N° des revendications visées <sup>13</sup>
X	Liebigs Annalen der Chemie, Verlag chemie 1-7 (Weinheim, DE) volume 614, 1958, H.H. Schlubach et al. "Die Bildung der verzweigten Polyfructosane in den Roggenhalmen" Pages 126-136 voir pages 131-2, 134 Cité dans la demande --	1-7
A	EP, A, 0337889 (ROUSSEL-UCLAF)) 18 octobre 1989 --	
A	Patent Abstract of Japan volume 13, No. 151 (C-584)(3499) 12 avril 1989 & JP, A, 63309183 (ICHIMARU PHARCOS CO.) 16 décembre 1988. --	
		. / .

\* Catégories spéciales de documents cités: <sup>11</sup>

- « A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- « E » document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- « L » document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- « O » document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- « P » document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

« T » document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

« X » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive

« Y » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.

« & » document qui fait partie de la même famille de brevets

## IV. CERTIFICATION

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée  
 16 mai 1991

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale  
 27.06.91

Administration chargée de la recherche internationale  
 OFFICE EUROPEEN DES BREVETS

Signature du fonctionnaire autorisé  
 Danielle van der Haas

III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUÉS SUR LA DEUXIÈME FEUILLE)
Catégorie *	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, des passages pertinents	N° des revendications visées
X	<p>Journal of the Chemical Society, 1951 Partie II, The Chemical Society, (London, GB), P.C. ARNI et al. "Studies on Fructosans" Pages 1822-30, voir l'article en entier</p> <p>---</p>	1-7

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE  
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

BE 9100014  
SA 44686

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 21/06/91  
Les renseignements fournis sont données à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A- 0337889	18-10-89	FR-A- 2629985 AU-A- 3274489 JP-A- 1311090 US-A- 4978751	20-10-89 19-10-89 15-12-89 18-12-90

EPO FORM N°0472